PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07K 14/00 — A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 98/47914**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02225

(22) Internationales Anmeldedatum: 16. April 1998 (16.04.98)

(30) Prioritätsdaten:
97106470.4 18. April 1997 (18.04.97) EP
(34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw.

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112–132, D–68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: HENGEL, Hartmut [DE/DE]; Würmtalstrasse 188, D–81375 München (DE). KOSZINOWSKI, Ulrich [DE/DE]; Klementinenstrasse 14, D–80805 München (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D–81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: US6 GENE FROM THE HUMAN CYTOMEGALOVIRUS (HCMV)

(54) Bezeichnung: US6 GEN AUS DEM HUMANEN CYTOMEGALOVIRUS (HCMV)

(57) Abstract

The invention relates to a gene (US6) from the human cytomegalovirus (HCMV), to a polypeptide coded by said gene, to an antibody directed against said polypeptide and to the pharmaceutical application thereof, specially in the modulation of the immune system and in the reduction of immunogenicity of transferred cells.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft das US6 Gen aus dem humanen Cytomegalovirus (HCMV), das davon codierten Polypeptid, einen gegen das Polypetid gerichteten Antikörper sowie dessen pharmazeutische Anwendung den, insbesondere in der Modulation des Immunsystems und in der Verringung der Immunogenität von transfizierten Zellen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

US6 GEN AUS DEM HUMANEN CYTOMEGALOVIRUS (HCMV)

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Gen aus dem humanen Cytomegalovirus (HCMV), ein davon codiertes Polypeptid, einen gegen das Polypeptid gerichteten Antikörper sowie die pharmazeutische Anwendung der Nucleinsäure, des Polypeptids und des Antikörpers.

Die T-Zell vermittelte Immunantwort spielt eine zentrale Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene. T-Zellen, die $\alpha\beta$-Rezeptoren exprimieren, sind auf die Erkennung von Peptiden spezialisiert, die durch MHC-codierte Moleküle präsentiert werden. Proteine, die während der viralen Genexpression synthetisiert worden sind, werden im Cytosol durch das Proteasom abgebaut. Dann werden Peptide mit Hilfe von Transportermolekülen (TAP) mit der schweren MHC-Klasse I Kette und β2-Mikroglobulin assembliert, um einen trimeren Komplex zu bilden (M. J. Androlewicz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 9130; J. J. Neefjes et al. Science 261 (1993) 769; T. Spies et al., Nature 355 (1992) 644; J. C. Shepard et al., Cell 74, (1993) 577). Dieser Komplex wird dann aus dem endoplasmatischen Reticulum (ER) durch das ER-Golgi-Intermediat Compartment (ERGIC)/cis-Golgi Netzwerk, das mittlere Golgi- und das Trans-Golgi (TGN) Netzwerk) zur Plasmamembran transportiert, wo der MHC Komplex das Peptid für cytotoxische CD8 T-Zellen präsentiert.

Während der Coevolution mit ihren Wirten haben Viren Mechanismen der Anpassung an das Immunsystem entwickelt. Einige Viren können trotz einer starken Immunreaktion persistieren. DNA-Viren, wie Pockenviren, Herpesviren und Adenoviren, enthalten Gene, welche das Entstehen einer Entzündungsreaktion durch Beeinflussung der Komplementkaskade und durch Wechselwirkung mit Cytokinen und Interferonen hemmen (Smith, Trends in Microbiol. 2 (1994), 81-88). Diese Gene scheinen von zellu-

lären Genen des jeweiligen Wirts abzustammen, und durch Sequenzhomologie kann ihre potentielle Funktion vorhergesagt werden.

Viren können jedoch auch die Antigenpräsentation über den MHC-Klasse I Mechanismus beeinflussen, indem sie auf Proteine, die bei der Antigenpräsentation beteiligt sind, einwirken. Für diese viralen Gene sind bisher noch keine zellulären Homologe gefunden worden. Somit besteht an ihnen ein besonderes Interesse, weil sie auf bislang noch unbekannte Funktionen in der Zellbiologie hinweisen können.

Herpesviren sind in der Lage, trotz des Vorhandenseins eines aktiven Immunsystems im Wirt eine lebenslange Infektion aufrechtzuerhalten. Cyotmegaloviren (CMV) stellen die β-Unterfamilie der Herpesviren dar und verursachen sowohl akute als auch chronische Infektionen. CMV Gene werden kaskadenartig exprimiert, wie es für Herpesviren während der sehr frühen (IE), der frühen (E), und der späten (L) Phase der Infektion kennzeichnend ist. Cytomegaloviren haben spezifische Funktionen entwickelt, um der zellulären Immunantwort zu entgehen. Sowohl humaner CMV (HCMV) als auch Maus CMV (MCMV) beeinflussen die Oberflächenexpression von MHC-Klasse I Molekülen und die Antigenpräsentation an CD8+ T-Lymphozyten (P. D. Barnes und J. G. Grundy, J. Gen Virol. 73 (1992) 2395; M. Del Val et al., Cell 58 (1989) 305; H. Hengel et al., J. Gen. Virol. 76 (1995) 2987). Der Befund, daß die Präsentation eines viralen Antigens von Maus Cytomegalovirus (MCMV), einem β-Herpesvirus, während der Phasen der Replikationskaskade stark reguliert ist (Reddehase et al., J. Virol. 60 (1986), 1125-1129; Del Val et al., Cell 58 (1989), 505-315), führte zu der Erkenntnis, daß die frühen MCMV-Gene die Expression von MHC-Klasse I Molekülen regulieren (Del Val et. al., J. Exp. Med. 176 (1992), 729-738; Campbell & Slater, J. Virol. 68 (1994) 1805-1811). Auch beim humanen Cytomegalovirus (Beersma et al. J. Immunol. 151 (1993), 4455-4464; Yamashita et al., Virology 193 (1993), 727-736; Warren et al., J. Virol. 68 (1994), 2822-2829) und beim

Herpes Simplex Virus Typ I (York et al., Cell 77 (1994), 525-535) konnte eine Hemmung der Antigenrepräsentation durch MHC-Klasse I Moleküle gezeigt werden.

Aus dem humanen Cytomegalovirus sind mehrere Genprodukte bekannt, welche als Inhibitoren von MHC-Klasse I Molekülen wirken. Beispiele sind die Genprodukte US3, US11 und US2 (siehe z. B. Jones et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 11327-11333; Jones et al., J. Virol. 69 (1995), 4830-4841; Wiertz et al. Cell 84 (1996), 769-779).

Die internationale Patentanmeldung WO 96/04383 offenbart HCMV-Deletions-Mutanten. Die Infektion von humanen Zellen mit drei dieser Mutanten, in denen jeweils die offenen Leserahmen IRS1-US11, US2-US11 bzw. IRS1-US9 + US11 entfernt wurden, führte zum Verlust der Kontrolle über die Oberflächenexpression von MHC-Klasse I Molekülen. Außerdem werden als für die virale MHC-Klasse I Kontrolle relevante Subregionen die offenen Leserahmen US11 sowie US2-US5 genannt. Die internationale Patentanmeldung WO 96/31241 offenbart Zellen, in denen verschiedene virale Proteine mit MHC-Klasse-I-inhibitorischer Wirkung exprimiert wurden. Zu diesen gehören die HCMV US5 und US11 Genprodukte. Die Veröffentlichung von Greaves et al. (J. Gen. Virol. 76, 2151-2160 (1995)) beschreibt die gezielte Deletion der HCMV-Gene IRS1 sowie US3 bis US5 und die Infektion humaner Zellen mit den Deletionsmutanten.

Aus dem Herpes-Simplex Virus Typ I ist das Protein ICP47 (McGeoch et al., J. Mol. Biol. 181 (1985), 1-13) bekannt, welches ebenfalls die Antigenpräsentation durch MHC-Klasse I Moleküle inhibiert (York et al., Cell. 77 (1994), 525-535; Früh et al. Nature 375 (1995), 415-418). Das Protein ICP47 wirkt als Inhibitor von Peptidtransportproteinen (TAP). Aus Adenoviren ist schließlich das Protein E3/19K bekannt, welches die schweren Ketten von MHC-Klasse I Transplantationsantigenen aus Mensch und Maus bindet (vgl. z. B. Signas et al., Nature 299 (1982), 175-178; Burgert et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 84 (1987), 1356-1360; Tanaka & Tevrethia, Virology 165 (1988), 357-366; Jefferies & Burgert, J. Exp. Med. 172 (1990), 1653-1664; Hermiston et al., J. Virol. 67 (1993), 5289-5298). Das Protein E3/19K zeigt eine direkte Assoziation mit MHC-Klasse I Molekülen von Mensch, Maus und Ratte, wodurch der intrazelluläre Transport und die Expression an der Zelloberfläche stark inhibiert werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, neue Gene zu identifizieren, welche die Antigenpräsentation durch MHC I Moleküle beeinflussen und somit als Immunmodulatoren wirken.

Die Erfindung beschreibt die Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung eines Gens aus humanem Cytomegalovirus, das als US6 bezeichnet wird und für ein neues Polypeptid codiert. Identifiziert wurde dieses Gen durch Transfektion in Säugerzellen als Inhibitor der MHC-Expression. Das Genprodukt des US6 Gens bewirkt eine signifikante Inhibierung der Oberflächenexpression von MHC I Molekülen. Das US6 Gen, das davon codierte Polypeptid sowie gegen das Polypeptid gerichtete Antikörper sind als diagnostische, therapeutische oder präventive Mittel für Erkrankungen geeignet, die mit Störungen der MHC-Klasse I Antigenpräsentation an der Zelloberfläche direkt oder indirekt assoziert sind. Insbesondere sind das Gen und das Polypeptid als Immunmodulatoren für die Gentherapie geeignet. Die Veröffentlichung von Hengel et al. (IMMUNITIY, 6, 623-632, Mai, 1997) wurde nach dem Anmeldetag der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht und offenbart den Gegenstand der vorliegenden Patentanmeldung. Die Veröffentlichungen von Ahn et al. (IMMUNITIY, 6, 613-621, Mai, 1997) und Lehner (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 6904-6909, Juni, 1997) wurden ebenfalls nach dem Anmeldetag der vorliegenden Patentanmeldung veröffentlicht und offenbaren ebenfalls biologische Funktionen des US6 HCMV-Gens.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nucleinsäure, welche für ein die MHC-Klasse I Antigenpräsentation beeinflussendes Polypeptid codiert, umfassend:

(a) die in SEQ ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz mindestens im Bereich zwischen den Nucleotiden 58 und 88,

(b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nucleotidsequenz oder

(c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nucleotidsequenz.

Die in SEQ ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz enthält einen offenen Leserahmen von 549 bp, der einem Polypeptid mit einer Länge von 183 Aminosäuren entspricht. Die Aminosäuresequenz dieses Polypeptids ist in SEQ ID No. 2 dargestellt. Das Polypeptid ist ein Typ I Transmembranglykoprotein mit einer berechneten Molekularmasse von 21 kDa.

Neben der in SEQ ID No. 1 gezeigten Nucleotidsequenz und einer dieser Sequenz im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nucleotidsequenz umfasst die Erfindung auch noch eine Nucleotidsequenz, die mit einer der zuvor genannten Sequenzen hybridisiert. Der Begriff "Hybridisierung" gemäß vorliegender Erfindung wird wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104) verwendet. Vorzugsweise spricht man von einer stringenten Hybridisierung, wenn nach Waschen für eine Stunde mit 1 x SSC und 0,1% SDS bei 50°C, vorzugsweise bei 55°C, besonders bevorzugt bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C, insbesondere für eine Stunde in 0,2 x SSC und 0,1% SDS bei 50°C, vorzugsweise bei 55°C, besonders bevorzugt bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C noch ein positives Hybridisierungssignal beobachtet wird. Eine unter derartigen Waschbedingungen mit der für SEQ ID No. 1 gezeigten Nucleotidsequenz oder einer damit im Rahmen der

Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nucleotidsequenz hybridisierende Nucleotidsequenz ist eine erfindungsgemäße Nucleotidsequenz.

Die erfindungsgemäße Nucleinsäure ist vorzugsweise nicht assoziiert mit anderen Protein-codierenden Nucleinsäureabschnitten aus HCMV. Weiterhin ist die erfindungsgemäße Nucleinsäure vorzugsweise in operativer Verknüpfung mit einer Expressionskontrollsequenz, die in eukaryontischen Zellen, insbesondere in Säugerzellen wirksam ist.

Vorzugsweise ist die erfindungsgemäße Nucleotidsequenz eine DNA. Sie kann jedoch auch eine RNA oder ein Nucleinsäureanalogon wie etwa eine peptidische Nucleinsäure umfassen. Besonders bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Nucleinsäure eine Sequenz, die zu der in SEQ ID No. 1 dargestellten Nucleotidsequenz und bevorzugt dem luminalen Abschnitt davon eine Homologie von mehr als 80%, vorzugsweise als 90 % und besonders bevorzugt mehr als 95 % aufweist.

Eine erfindungsgemäße modifizierte Nucleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Nucleinsäureanalogon enthält mindestens einen 12 Basen, vorzugsweise mindestens 15 Basen langen Abschnitt der Nucleinsäuresequenz wie zuvor angegeben. Solche Substanzen sind als Hybridisierungssonden, Antisense-Moleküle bzw. katalytisch aktive Ribozyme geeignet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein von einer Nucleinsäure wie oben angegeben codiertes Polypeptid. Dieses Polypeptid weist vorzugsweise

a) die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz mindestens im Bereich zwischen den Aminosäuren 20 und 29,

b) eine mehr als 70 %, vorzugsweise mehr als 80 % und besonders bevorzugt mehr als 90 % zur Sequenz aus (a) homologe Aminosäuresequenz oder/und

c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) immunologisch kreuzreaktive Aminosäuresequenz auf.

Erfindungsgemäße Nucleinsäuren sind aus Cytomegaloviren, insbesondere aus humanen Cytomegaloviren erhältlich. Sie können nach bekannten Techniken unter Verwendung kurzer Abschnitte der in SEQ ID No. 1 gezeigten Nucleotidsequenz als Hybridisierungssonden oder/und Primer nach bekannten Methoden isoliert werden. Weiterhin können erfindungsgemäße Nucleinsäuren durch Mutagenese aus natürlich vorkommenden Nucleinsäuren oder durch chemische Synthese hergestellt werden. Bei der chemischen Synthese können gegebenenfalls anstelle der üblichen Nucleotidbausteine auch modifizierte Nucleotidbausteine eingesetzt werden. Nucleinsäuren, die teilweise oder vollständig aus modifizierten Nucleotidbausteinen bestehen oder Nucleinsäureanaloga wie etwa peptidische Nucleinsäuren, deren Basensequenz einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure entspricht, können beispielsweise als therapeutische Mittel eingesetzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinanter Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure enthält. Dieser Vektor kann ein beliebiger prokaryontischer oder eukaryontischer Vektor sein, auf dem sich die erfindungsgemäße Nucleinsäure unter Kontrolle eines Expressionssignals (Promotor, Operator, Enhancer etc.) befindet. Beispiele für prokaryontische Vektoren sind chromosomale Vektoren wie etwa Bakteriophagen und extrachomosomale Vektoren wie etwa Plasmide, wobei zirkuläre Plasmidvektoren besonders bevorzugt sind. Geeignete prokaryontischen Vektoren sind z. B. bei Sambrook et al., Supra, Kap. 1-4 beschrieben.

Besonders bevorzugt ist der erfindungsgemäßer Vektor ein eukaryontischer Vektor, insbesondere ein Vektor für Säugerzellen. Besonders bevorzugte Vektoren sind für die Gentherapie geeignete Vektoren wie etwa Retroviren, modifizierte Adenoviren oder Adeno-assoziierte Viren. Derartige Vektoren sind dem

Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie und Gentherapie geläufig. Insbesondere wird in diesem Zusammenhang auf Sambrook et al., supra, Kap. 16 auf Kriegler, M.; Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual; Freeman and Company (N.Y.) 1990 und auf Vos, I.M.H.; Viruses in human gene therapy; Caroline Academic Press, 1995 verwiesen.

Neben dem in SEQ ID No. 2 dargestellten Polypeptid betrifft die Erfindung auch Muteine, Varianten und Fragmente davon. Darunter sind Sequenzen zu verstehen, die sich durch Substitution, Deletion oder/und Insertion einzelner Aminosäuren oder kurzer Aminosäureabschnitte von der in SEQ ID No. 2 dargestellten Aminosäurensequenz unterscheiden.

Unter den Begriff "Variante" fallen sowohl natürlich vorkommende Variationen in einzelnen Virenstämmen sowie durch rekombinante DNA Technologie (insbesondere in vitro Mutagenese mit Hilfe von chemisch synthetisierten Oligonucleotiden) erzeugte Proteine, die in der Lage sind, die Antigenpräsentation von MHC Klasse I Molekülen an der Oberfläche von Zellen zu beeinflussen. Ebenfalls fallen unter diesen Begriff auch chemisch modifizierte Polypeptide, die an den Termini oder/und reaktiven Aminosäurenseitengruppen durch Acylierung, z. B. Acetylierung, oder Amidierung modifiziert sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert, bzw. transfiziert ist. Die Zelle kann sowohl eine eukaryontische als auch eine prokaryontische Zelle sein. Verfahren zur Transformation von Zellen mit Nucleinsäuren sind allgemeiner Stand der Technik und brauchen daher nicht näher erläutert zu werden. Beispiele für besonders bevorzugte Zellen sind eukaryontische Zellen, insbesondere tierische Zellen und besonders bevorzugt Säugerzellen.

Ebenfalls ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids oder Fragmenten dieses Polypeptids als Immunogen zur Herstellung von Antikörpern. Die Herstellung von Antikörpern kann dabei auf übliche Weise durch Immunisierung von Versuchstieren mit dem vollständigen Polypeptid oder Fragmenten davon und anschließende Gewinnung der resultierenden polyklonalen Antiseren erfolgen. Nach der Methode von Köhler und Milstein oder deren Weiterentwicklungen können aus den Antikörper-produzierenden Zellen der Versuchstiere auf bekannte Weise durch Zellfusion monoklonale Antikörper erhalten werden. Ebenso können nach bekannten Methoden humane monoklonale Antikörper hergestellt werden. Als Immunogen bevorzugt sind das rekombinante US6 Protein oder Peptidfragmente hiervon.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Antikörper gegen das US6 Protein oder eine Variante davon, vorzugsweise ein Antikörper, der keine Kreuzreaktion mit anderen CMV-codierten Proteinen zeigt. Besonders bevorzugt ist der Antikörper gegen das gesamte Polypeptid oder gegen eine Peptidsequenz gerichtet, die den Aminosäuren 20 bis 29 der in SEQ ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenz entspricht.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktive Komponenten Nucleinsäuren, modifizierte Nucleinsäuren oder Nucleinsäurenanaloga, Vektoren, Zellen, Polypeptide oder Antikörper wie zuvor angegeben, enthält.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann weiterhin pharmazeutisch übliche Träger-, Hilfs- oder/und Zusatzstoffe sowie gegebenenfalls weitere aktive Komponenten enthalten. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann insbesondere für diagnostische Zwecke oder zur Herstellung eines therapeutischen Mittels eingesetzt werden. Besonders bevorzugt ist die Verwendung als therapeutisches Mittel zur Modulation des Immunsystems. Diese Modulation des Immunsystems kann durch

Beeinflussung, insbesondere durch Inhibierung, der Antigenpräsentation von MHC-Klasse I Molekülen an der Oberfläche von Zellen erreicht werden.

Aufgrund der immunmodulatorischen Eigenschaften des US6 Genprodukts eignet sich die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung insbesondere für Anwendungen in der Gentherapie, z. B. zur Verringerung der Immunogenität von transfizierten Zellen. Hierzu wird eine erfindungsgemäße Nucleinsäure in operativer Verknüpfung mit einem in der vorgesehenen Wirtszelle aktiven Expressionssignal in einen für gentherapeutische Zwecke geeigneten Transfektionsvektor eingebaut. Durch Expression des US6 Genprodukts in der mit dem Vektor transfizierten Zelle wird eine Erkennung der transfizierten Zelle durch das Immunsystem verhindert oder doch zumindest verringert. Die erfindungsgemäße Nucleinsäure kann sowohl im Körper als auch extrakorporal in Zellen eingebracht werden.

Gegebenenfalls kann die erfindungsgemäße Nucleinsäure zusammen mit anderen bereits bekannten immunmodulatorisch wirkenden Mitteln eingesetzt werden, die beispielsweise ausgewählt sein können aus viralen MHC I Inhibitoren und dafür codierenden Nucleinsäuren. Spezifische Beispiele sind die eingangs genannten viralen Gene US2, US3, US11, ICP47 und E3/19K sowie deren Genprodukte.

Dabei zeichnet sich der erfindungsgemäße Inhibitor gegenüber bekannten Inhibitoren dadurch aus, daß er in einem recht späten Stadium in den Mechanismus zur Präsentation von Antigenen durch den MHC-Klasse I Komplex an der Oberfläche von Zellen eingreift. Diese späte Blockierung kann auf besonders vorteilhafte Weise mit den frühen Blockierungen durch die Inhibitoren des Standes der Technik kombiniert werden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und Sequenzprotokolle näher erläutert:

Es zeigen:

SEQ ID No. 1. eine Nucleotidsequenz, die für das US6 Gen codierende genetische Information enthält und

SEQ ID No. 2 die Aminosäuresequenz des US6 Gen Produkts.

Die beigefügten Fig. 1 und 2 sind wie folgt:

Fig. 1 zeigt, daß die US6-Expression die $CD8^+$ T-Zellerkennung, die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression und die MHC-Klasse-I-Komplexbildung aufgrund einer Inhibierung des TAP-vermittelten Peptidtransports verhindert.

(A) 293-Zellen, welche mit dem Plasmid pcDNAI-US6 oder einer Kontrolle (pcDNAI) stabil transfiziert worden waren, wurden mit ^{51}Cr markiert und in einem 4-Stunden-Standard-Freisetzungs-Assay mit einer abgestuften Anzahl von Effektorzellen getestet. Die Effektoren waren die HLA-A2 allospezifischen $CD8^+$ CTL-Klone IE2 (Kreise) und JS132 (Dreiecke) (Goulmy et al., Immunigenetics 20 (1984) 13).

(B) Cytofluorometrische Analyse der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression von HeLa-Zellen, welche mit pcDNAI-US6 transfiziert waren und HeLa-Kontrollzellen. Die Zellen wurden mit den monoklonalen Antikörpern W6/32 (ATCC HB95), der HLA-Klasse-I-schwere-Kette/β_2m Dimere erkennt (dicke Linien) oder BA06 (Onocogene Science, Uniondale, N. Y.), der gegen CD44 gerichtet ist (dünne Linien), inkubiert und anschließend mit Ziege-Anti-Maus IgG-FITC angefärbt. Die gestrichelte Linie ist eine Kontrollanfärbung mit lediglich dem zweiten Antikörper.

(C) Die ATP-abhängige Peptidtranslokation wurde für permeabilisierte HeLa-Zellen und einzelne US6-transfizierte Klone (oberes und mittleres Diagramm) bzw. Zellen der Zellinie 293 und 293-US6-Transfektanten (unteres Diagramm) analysiert. Dazu wurde ein wie bei Hengel et al., J. Gen. Virol. 77 (1996) 2287 beschriebener Transportassay durchgeführt. Hierzu wurden die Peptide Nr. 67 (RYWANATRSF), Nr. 600 (TNKTRIDGQY) und Nr. 802

(RRYQNSTEL) durch Chloramin-T-katalysierte Jodierung mit ^{125}I radiomarkiert. Die Zellen wurden mit Streptolysin O (2,5 U/ml) permeabilisiert. 1,25 x 10^6 Zellen pro Probe wurden mit dem Peptid (1 μM) und 10 mM ATP in 0,1 ml Inkubationspuffer (130 mM KCl, 5 mM Hepes pH 7,3, 10 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 2 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Lyse in 1% NP40 wurde die glykosilierte Peptidfraktion mit 30 μl Concanavalin A (ConA) Sepharose-Aufschlämmung isoliert und durch γ-Zählung quantifiziert. Die nach Con A Behandlung erhaltenen Impulse pro Minute (c.p.m.) wurden als Prozent der eingesetzten c.p.m. angegeben.

HeLa-Zellen wurden über Nacht mit einem US6-rekombinanten Vaccinia-Virus oder einem Kontroll-Vaccinia-Virus mit einer Infektionsmultiplizität von 3 infiziert. Die schwarzen Balken stellen die Transportgeschwindigkeit in Gegenwart von ATP dar, die weißen Balken in Abwesenheit von ATP als Kontrolle. Es ist jeweils der Mittelwert aus 2 Versuchen angegeben.

(D) Nichttransfizierte und US6-transfizierte HeLa-Zellen wurden für 25 Minuten metabolisch markiert. Lysate in 1 % NP40 wurden vor der Immunpräzipitation mit dem mAb W6/32 entweder bei 4°C gehalten oder bei 37°C für die angegebene Zeit inkubiert. Präzipierte Moleküle wurden mit Endoglycosidase H(Endo H) gespalten. "s" zeigt Endo-H-sensitive MHC-Klasse-I-Moleküle an.

(E) Die Kinetik der TAP-Funktion wurde mit dem Peptid RYWANATRSF (gestrichelte Linie) während einer permissiven Infektion von MRC-5-Fibroblasten mit HCMV AD169 (Infektionsmultiplizität = 5) bestimmt. Der Grad der US6-Expression in mit HCMV AD169 inifizierten MRC-5-Zellen wurde durch Immunpräzipitation mit Anti-US6-Antiserum bestimmt. Bei dem Antiserum handelte es sich um ein polyklonales Kaninchen-Antiserum, welches durch Immunisierung von Kaninchen mit KLH-gekoppelten synthetischen Peptiden der Amminosäuren 20 - 29 der US6-Sequenz hergestellt wurde. Der Grad der US6-Expression wurde

dann durch SDS-PAGE analysiert (oben). Die US6-Expression (durchgezogene Linie) ist in willkürlichen Einheiten nach Phosphoimager-Quantifizierung der US6-Banden gezeigt.

In Fig. 2 ist die Identifizierung und Charakterisierung von US6-assoziierten Proteinen des endoplasmatischen Reticulums (ER) gezeigt.

(A) HeLa- und HeLa-US6-Transfektanten wurden über Nacht metabolisch markiert und in einem Digitonin-Lysepuffer lysiert. US6 wurde mit einem Kaninchen-Anti-US6-Antiserum immunpräzipitiert, und die Proteine wurden gelektrophoretisch aufgetrennt. Die Immunpräzipitation wurde wie von H. Hengel et al., J. Gen. Virol. 76 (1995) 2987 und H. Hengel et al. J. Gen. Virol. 77 (1996) 2287 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden semikonfluente Schichten von HeLa-Zellen mit IFNγ (500 U/ml) inkubiert und über Nacht mit [^{35}S]-Methionin und [^{35}S]-Cystein (1200 Ci/mmol; Amersham, Braunschweig, Germany) bei einer Konzentration von 350 µCi/ml markiert und in einem Lysepuffer (140 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,6, 5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM PMSF, Leupeptin und Leustatin) mit 1 % Detergens wie angegeben lysiert. Nach dem Entfernen der Zellkerne durch Zentrifugation wurden die Lysate mit präimmunem Kaninchenserum und Protein-A-Sepharose vorgereinigt. Immunkomplexe wurden mit Probepuffer eluiert und durch 10 - 15 % Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese analysiert. Die Gele wurden mit Amplify (Amersham) behandelt, getrocknet und mit BioMaxMR-Filmen (Kodak) bei -70°C für 1 bis 7 Tage entwickelt.

US6-assoziierte Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die erhaltenen Immunkomplexe wurden mit Endo H (2mU pro Probe, 37 °C über Nacht) gespalten oder einer Scheinbehandlung unterzogen. Die Banden mit einer Mobilitätsänderung nach Endo H-Spaltung sind durch ein "s" angezeigt.

(B) HeLa-US6-Zellen wurden, wie unter (A) beschrieben, metabolisch markiert und in einem Digitonin-Lysepuffer lysiert. Das

mit Anti-US6-Antiserum präzipitierte Material wurde erwärmt und in einem 1%igen NP40/1,5%igen SDS-Puffer gelöst. Proteine, die nicht vom Protein-A-Sepharose-Pellet dissoziierten, wurden in Spur 1 analysiert. Aliquots des Überstands wurden mit monoklonalen Antikörper gegen TAP1 und TAP2 (Spur 2), Kaninchen-Anti-HC-Antiserum (Spur 3), Anticalnexin mAb (Spur 4), Kaninchen-Anticalreticulin-Antiserum (Spur 5) und Kaninchen Anti-BiP-Antiserum (Spur 6) nochmals präzipitiert.

Beispiele

1. Methoden

1.1 Klonierungsarbeiten, Viruspropagierung und Herstellung rekombinanter Vacciniaviren

HCMV Stamm AD 169 (ATCC-VR538) wurde nach Standardmethoden in der Gewebekultur gezüchtet. Der offene Leserahmen des US6 Gens wurde nach PCR Amplifikation von HCMV AD169 DNA kloniert. Die Primer waren wie folgt: Vorwärtsprimer 5'-CGC GGG GGA TCC GCC GCC ATG GAT CTC TTG ATT CGT CTC-3'; Rückwärtsprimer 5'-CGC GGG TCT AGA GAA TTC GCA TCA GGA GCC ACA ACG TCG-3'. Das PCR Produkt wurde unter Verwendung der 5'-BamHI- und der 3'-EcoRI-Restriktionsstellen in das Plasmid p7.5K131 (H. J. Schlicht et al., J. Virol. 63 (1989) 5399) kloniert. Dieses Plasmid wurde dann zur Herstellung eines rekombinanten Vacciniavirus nach homologer Rekombination mit dem Vacciniastamm Kopenhagen verwendet. Die Expression des US6 Gens im Vacciniavirus erfolgt unter Kontrolle des Vaccinia 7.5K Promotors.

Parallel dazu wurde der offene Leserahmen des US6 Gens nach PCR Amplifikation von HCMV AD169 DNA in den Expressionsvektor pcDNAIneo (Invitrogen, San Diego, CA) unter Verwendung des Vorwärtsprimers 5'-CGC GGG GGA TCC GCC GCC ATG GAT CTC TTG ATT CGT CTC-3' und des Rückwärtsprimers 5'-CGC GGG TCT AGA GAA TTC GCA TCA GGA GCC ACA ACG TCG-3' kloniert, was in einem Amplifikationsprodukt von 591 bp resultierte.

Weiterhin wurde ein US6 Konstrukt welches 3'-seitig die 24 bp lange FLAG Sequenz (Eastman Kodak, New Heaven, CT) enthielt unter Verwendung des Rückwärtsprimers 5'-CGC CCC TCT AGA TTA CTA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC CTC GAG GAT ATC GGA GCC ACA ACG TCG AAT GGG ACG-3' hergestellt. Das PCR Produkt wurde in die 5'BamHI und 3'XbaI Restriktionsstellen von pcDNAIneo kloniert. Die hydrophile FLAG Sequenz (N-AspTyrLysAspAspAsp-AspLys-C) ist mit einem kurzen Oligopeptidspacer (Asp, Ile, Leu, Glu) an die für US6 kodierende Sequenz fusioniert.

1.2 Zellen und Transfektanten

Menschliche Nierenzellen der Zellinie 293 und HeLa-Zellen wurden mit Plasmid DNA durch Calciumphosphatpräzipitation transfiziert. Zellklone wurden in Gegenwart von 0,5 mg/ml G418 selektiert und auf US6-Proteinexpression durch Immunpräzipitation mit US6 spezifischen Antikörpern untersucht.

2. Ergebnisse

2.1

Auf der Suche nach viralen Genen, die eine TAP Hemmung verursachen, wurden die offenen Leserahmen (orf) der HCMV-Gene US1, US2, US3, US4, US5, US6, US7, US8/9, US10, US12 und US13 in HLA-A2$^+$ 293-Nierenzellen und HeLa Zellen stabil exprimiert. Die Transfektanten wurden auf Antigenpräsentation an HLA-A2 allospezifischen CD8$^+$ CTL Klonen, MHC-Klasse I Oberflächenexpression und TAP-vermittelten Peptidtransport gescreent. Die isolierten Gene US2 (Daten nicht gezeigt) und US6 reduzierten sowohl die Oberflächenexpression von MHC-Klasse I Molekülen als auch die Erkennung durch CD^{8+}CTL (Fig. 1A und B). In HeLa oder 293-Zellen, welche mit US6 stabil transfiziert waren oder mit einem rekombinanten, US6 exprimierenden Vacciniavirus infiziert waren, wurde eine signifikante Verringerung des Peptidtransports durch TAP gefunden (Fig. 1C). Diese Verringerung war vergleichbar mit der Hemmung, die in Transfektanten

beobachtet wurde, die den TAP-Inhibitor ICP47 des Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) exprimieren (A. Hill et al., Nature 375 (1995) 411; K. Früh et al., Nature 375 (1995) 415). Gleichermaßen hemmte ein US6 Polypeptid, welches mit der hydrophilen FLAG-Sequenz am C-Terminus markiert war, den Peptidtransport durch TAP (Fig. 1C).

Darüber hinaus war die Bildung von HC/β_2m Heterodimeren, die durch mAb W6/32 nachgewiesen wurden, in HeLa US6 Zellen drastisch verringert. Diese Komplexe waren bei 37°C in NP40 Lysaten instabil und blieben gegenüber Endoglykosidase H (EndoH) sensitiv (Fig. 1D), was auf eine defekte Peptidbeladung hinweist (J. J. Neefjes et al., J. Exp. Med. 178 (1993) 1971; A. Townsend et al., Cell 62 (1990) 285).

Die Kinetik der US6 Proteinexpression in HCMV Wildtyp AD169 infizierten Fibroblasten während des Verlaufs einer permissiven Infektion wurde nach metabolischer Markierung und Immunpräzipitation zusammen mit der Peptidtranslokationsfunktion beurteilt. Wie in Figur 1E dargestellt, korrelierte die kontinuierliche Abnahme des Peptidtransports mit der US6 Proteinsynthese, welche 72 Stunden nach der Infektion ein Maximum erreichte. Dies deutet darauf hin, daß US6 die TAP-abhängige Peptidtranslokation in das ER hemmt.

2.2 Subzelluläre Verteilung des US6 Proteins

Die Aminosäuresequenz von US6 entspricht einem Typ Ia Transmembranprotein mit einer Masse von 21 KD und einer möglichen N-verknüpften Glykosilierungsstelle. Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung des US6 Proteins wurde eine konfokale Laserscann-Mikroskopie an transfizierten HeLa Zellen unter Verwendung eines affinitätsgereinigten polyklonalen Kaninchen-Antiserums, welches die luminale Domäne des Proteins US6 erkennt, durchgeführt. Hierzu wurden HeLa-US6-Transfektanten mit 500 U/ml IFNγ für 48 Stunden vorbehandelt, bevor sie einer Paraformaldehydfixierung und Solubilisierung mit 0,1 % NP40

unterzogen wurden. Die Zellen wurden markiert mit (A), einem polyklonalen Kaninchen-Anti US6-Antiserum, welches durch Immunisierung von Kaninchen mit KLH-gekoppelten synthetischen Peptiden der Aminosäuren 20 - 29 der US6-Sequenz erzeugt wurde und Antikörpern gegen die zelluläre Proteine TAP1, BiP, p53 bzw. gegen die cis- und medial-Zisternen des Golgi und anschließend angefärbt mit Ziege-Anti-Kaninchen IgG-FITC und Ziege-Anti-Maus IgG-TRITC. Dabei wurde in HeLa-US6-Zellen ein typisches ER Anfärbemuster beobachtet, während HeLa Kontrollzellen negativ waren. Die Lokalisierung des Polypeptids US6 im ER wurde durch die nahezu perfekte Kolokalisierung mit dem ER-Markerprotein BiP (G. Russ et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 21312; D. Vaux et al., Nature 345 (1990) 495) und mit TAP1 (G. Russ et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 21312) bestätigt. Das Verteilungsmuster von US6 unterschieden sich hingegen deutlich von dem des Markers p53 für das endoplasmatischen Reticulum Golgi Zwischenkompartement (ERGIC) (A. Schweizer et al., Europ. J. Cell. Biol. 53 (1990) 185; Figur 2D) und dem, welches mit einem coatomerspezifischen mAb, der an Cis- und Medial-Golgi-Zisternen bindet, (B. J. Palmer et al., J. Biol. Chem. 268 (1993) 12083) erhalten wurde.

2.3 Wechselwirkung von US6 mit zellulären Komponenten

Zur Untersuchung, mit welchen zellulären Komponenten US6 wechselwirkt, wurde US6 aus Digitonin-Lysaten, welche aus HeLa-US6 Transfektanten hergestellt wurden, immunpräzipitiert. Dabei wurden Banden mit ungefähren Molekulargewichten von 97 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 48 kDa und 44 kDa zusammen mit US6 kopräzipitiert (siehe Fig. 2A). Es wurde festgestellt, daß davon nur die Banden bei 48 kDa, 44 kDa und 21 kDa vollständig sensitiv gegenüber Endoglykosidase H waren, was eine N-verknüpfte Glykosilierung und Retention dieser Moleküle im ER anzeigt. Zur Identifizierung der Bestandteile der US6 Komplexe wurde das aus einem Digitonin-Lysat von HeLa-US6 Zellen gewonnene Immunpräzipitat in einem 1,5 % SDS enthaltenden NP40 Lysepuffer

erwärmt, was in der Freisetzung der Proteine resultierte (siehe Fig. 2B, Spur 1).

Für eine Reimmunpräzipitation wurden HeLa-US6- und Kontrollzellen über Nacht metabolisch markiert und in einem 1%igen Digitonin-Lysin-Puffer lysiert, bevor eine Immunpräzipitation mit Anti-US6-Antikörpern durchgeführt wurde. Nach dem Waschen wurden die präzipitierten Proteine in einem 1,5 % SDS enthaltenden 1 % NP40 Lysepuffer gelöst und für 35 min auf 65 °C erwärmt. Nach Verdünnung auf eine SDS Endkonzentration von 0,15 % wurden die Anti-US6-Antikörper durch zweimalige Inkubation mit Protein A-Sepharose entfernt, bevor eine Reimmunpräzipitation des Überstands mit polyklonalen Kaninchenantikörpern gegen Calreticulin und BiP (StressGen, Victoria, BC, Kanada), freies MHC I Schwere Kette (HC) (bezogen von Dr. H. L. Ploegh, Cambridge, MA) und gegen Calnexin (bezogen von Dr. M. Brenner, Boston, MA) durchgeführt wurde.

Eine Repräzipitation mit Antikörpern gegen TAP1 und TAP2 (Fig. 2B, Spur 2) Klasse I HC (Fig. 2B, Spur 3) und Calnexin (Fig. 2B, Spur 4) ergab deutliche Banden mit den erwarteten Molekulargewichten der Proteine zusammen mit einer schwächeren Bande bei 21 kDa, die US6 entspricht. Eine Repräzipitation mit Anti-TAP1/2 oder Anti-Klasse I schwere Kette resultierte ebenfalls in einer Bande von 48 kDa, welche Tapasin entspricht (B. Ortmann et al., Nature 368 (1995) 864; B. Sadasivan et al., Immunity 5 (1996) 103).

Eine Repräzipitation mit einem Anti-Calreticulin-Antikörper (Fig. 2B, Spur 5) ergab kleine Mengen von US6, während dies mit Anti-BiP nicht der Fall war (Fig. 2B, Spur 6). Im Gegensatz dazu gelang es bei der Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen β_2-Mikroglobulin (β_2m) nicht, das Protein US6 zurückzugewinnen. Daraus ist ersichtlich, daß US6 eine direkte Wechselwirkung mit dem vor kurzem beschriebenen transienten Assemblierungskomplex zeigt, der TAP1/2, Tapasin, Klasse I HC und Calreticulin enthält (B. Sadasivan et al., Immunity 5 (1996),

103). Zusätzlich bindet US6 am Calnexin, welches als molekulares Chaperon in Schritten vor der Faltung der schweren MHC I Kette beteiligt ist (E. Degen et al., J. Cell. Biol. 112 (1991), 1099; S. Rajagopalan et al., Science 263 (1994), 387).

2.4 Zellulärer Wirkungsmechanismus von US6

2.4.1

Es wurde gezeigt, daß der Cytosol-TAP-Inhibitor ICP47 mit der ATP-unabhängigen Bindung von Peptiden an den Transporter konkurriert (K. Ahn et al., EMBO J. 15 (1996), 3247; R. Tomazin et al., EMBO J. 15 (1996), 3256). Unter Verwendung des photoaktivierbaren radiojodierten Peptids [125 I] TYDNKTRA [4-Trifluormethyl-diazirinyl) phenylalanin] wurde untersucht, ob eine Bindung von Peptiden an TAP in Gegenwart von US6 auftreten kann. Hierzu wurden nach der Methode von Nijenhuis et al., J. Immunol. 156 (1996), 2186 steigende Mengen des Photopeptids mit Mikrosomen inkubiert, die aus vacUS6 infizierten und vac-Kontroll-infizierten HeLa-Zellen in Abwesenheit von ATP präpariert worden waren. Die UV-Quervernetzung und Immunpräzipitation mit TAP1 spezifischen Antikörpern resulierte in einer Bande bei 70 kDa, deren Intensität im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert war. Dieses Ergebnis zeigt, daß der Mechanismus von US6 für die Blockade des Peptidtransports durch TAP verschieden von ICP47 ist, das direkt die Peptidbindung an TAP hemmt.

2.4.2

Um zu untersuchen, welche Rolle die US6-assoziierten Polypeptide für die Inaktivierung von TAP1/2 spielen, wurde US6 mRNA (hergestellt durch in vitro Transkription von pcDNAIneo-US6 mit T+ RNA-Polymerase, Promega, Heidelberg, Deutschland) in Gegenwart von Mikrosomen in vitro translatiert, die aus HLA-A,B$^-$C$^-$ Tapasin-negativen LCL721.220 und HLA-A,B,C-negativen, aber Tapasin-positiven LCL721.221 Lymphoblastoidzelllinien

hergestellt worden waren (B. Sadasivan et al., Immunity 5 (1996) 103; R. De Mars et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 82 (1985) 8183; R. Greenwood et al., J. Immunol. 153 (1994), 5525; Grandea III et al., Science 270 (1995) 105). Die Mikrosomen wurden auf ATP abhängigen Peptidimport untersucht. In Gegenwart von US6 konnten die Mikrosomen aus keiner der beiden Zellinien Peptide ansammeln. MHC Klasse I schwere Ketten und Tapasin sind somit für die funktionelle Inaktivierung von TAP 1/2 entbehrlich.

2.4.3

HCMV exprimiert eine Kaskade von aufeinanderfolgenden US-Genfunktionen, welche den Mechanismus der Antigenpräsentation durch MHC Klasse I Moleküle unterbrechen. Das (IE) Protein gpUS3, welches am Anfang einer Infektion exprimiert wird, behindert den Transport von MHC Klasse I Komplexen (K. Ahn et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 93 (1996), 10990; T. R. Jones et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 93 (1996), 11327). Die von US2 und US11 kodierten Glykoproteine leiten gebildetes MHC Klasse I HC in das Cytosol, wo es schnell abgebaut wird (E. Wiertz et al., Cell 84 (1996), 769). Beide Gene werden praktisch bis zu einer Zeitdauer von 24 h nach einer Infektion stark exprimiert, zu späteren Zeiten aber nur sehr schwach transkribiert (T. R. Jones et al., J. Virol. 65 (1991) 2024; D. J. Tenney et al., J. Virol. 65 (1991) 6724). Im Gegensatz dazu findet das maximale Auftreten von US6 48 bis 96 h nach einer Infektion statt, wenn andere Gene, welche mit der MHC Klasse I Antigenpräsentation interferieren, faktisch keine Rolle mehr spielen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
(B) STRASSE: Sandhofer Strasse 112-132
(C) ORT: Mannheim-Waldhof
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 68305

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Gen aus dem humanen Cytomegalovirus

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 552 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: beides
(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:1..549

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
ATG GAT CTC TTG ATT CGT CTC GGT TTT CTG TTG ATG TGT GCG TTG CCG        48
Met Asp Leu Leu Ile Arg Leu Gly Phe Leu Leu Met Cys Ala Leu Pro
 1               5                  10                  15

ACC CCC GGT GAG CGG TCT TCG CGT GAC CCG AAA ACC CTT CTC TCT CTG        96
Thr Pro Gly Glu Arg Ser Ser Arg Asp Pro Lys Thr Leu Leu Ser Leu
            20                  25                  30

TCT CCG CGA CAA CAA GCT TGT GTT CCG AGA ACG AAG TCG CAC AGA CCC       144
Ser Pro Arg Gln Gln Ala Cys Val Pro Arg Thr Lys Ser His Arg Pro
        35                  40                  45

GTT TGT TAC AAC GAT ACA GGG GAC TGC ACA GAT GCA GAT GAT AGC TGG       192
Val Cys Tyr Asn Asp Thr Gly Asp Cys Thr Asp Ala Asp Asp Ser Trp
    50                  55                  60
```

```
AAA CAG CTG GGT GAG GAC TTT GCG CAC CAA TGC TTG CAG GCG GCG AAA        240
Lys Gln Leu Gly Glu Asp Phe Ala His Gln Cys Leu Gln Ala Ala Lys
 65                  70                  75                  80

AAG AGG CCT AAA ACG CAC AAA TCC CGT CCG AAC GAT AGG AAC CTT GAG        288
Lys Arg Pro Lys Thr His Lys Ser Arg Pro Asn Asp Arg Asn Leu Glu
            85                  90                  95

GGT AGG CTG ACC TGT CAA CGA GTC CGT CGG CTA CTG CCC TGT GAT TTG        336
Gly Arg Leu Thr Cys Gln Arg Val Arg Arg Leu Leu Pro Cys Asp Leu
        100                 105                 110

GAT ATT CAT CCT AGC CAC CGG TTG TTA ACG CTT ATG AAT AAC TGC GTC        384
Asp Ile His Pro Ser His Arg Leu Leu Thr Leu Met Asn Asn Cys Val
    115                 120                 125

TGT GAC GGG GCC GTT TGG AAC GCG TTT CGC TTG ATA GAA CGA CAC GGA        432
Cys Asp Gly Ala Val Trp Asn Ala Phe Arg Leu Ile Glu Arg His Gly
130                 135                 140

TTC TTC GCT GTG ACT TTG TAT TTA TGT TGC GGG ATT ACC CTG CTG GTT        480
Phe Phe Ala Val Thr Leu Tyr Leu Cys Cys Gly Ile Thr Leu Leu Val
145                 150                 155                 160

GTT ATT CTA GCA TTG CTG TGC AGC ATA ACA TAC GAA TCG ACT GGA CGT        528
Val Ile Leu Ala Leu Leu Cys Ser Ile Thr Tyr Glu Ser Thr Gly Arg
                165                 170                 175

GGG ATT CGA CGT TGT GGC TCC TGA                                       552
Gly Ile Arg Arg Cys Gly Ser
            180
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 183 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```
Met Asp Leu Leu Ile Arg Leu Gly Phe Leu Leu Met Cys Ala Leu Pro
 1               5                  10                  15

Thr Pro Gly Glu Arg Ser Ser Arg Asp Pro Lys Thr Leu Leu Ser Leu
            20                  25                  30

Ser Pro Arg Gln Gln Ala Cys Val Pro Arg Thr Lys Ser His Arg Pro
        35                  40                  45

Val Cys Tyr Asn Asp Thr Gly Asp Cys Thr Asp Ala Asp Asp Ser Trp
    50                  55                  60

Lys Gln Leu Gly Glu Asp Phe Ala His Gln Cys Leu Gln Ala Ala Lys
65                  70                  75                  80

Lys Arg Pro Lys Thr His Lys Ser Arg Pro Asn Asp Arg Asn Leu Glu
                85                  90                  95

Gly Arg Leu Thr Cys Gln Arg Val Arg Arg Leu Leu Pro Cys Asp Leu
            100                 105                 110
```

Asp Ile His Pro Ser His Arg Leu Leu Thr Leu Met Asn Asn Cys Val
115 120 125

Cys Asp Gly Ala Val Trp Asn Ala Phe Arg Leu Ile Glu Arg His Gly
130 135 140

Phe Phe Ala Val Thr Leu Tyr Leu Cys Cys Gly Ile Thr Leu Leu Val
145 150 155 160

Val Ile Leu Ala Leu Leu Cys Ser Ile Thr Tyr Glu Ser Thr Gly Arg
165 170 175

Gly Ile Arg Arg Cys Gly Ser
180

Ansprüche

1). Isolierte Nucleinsäure, welche für ein die MHC Klasse I Antigenpräsentation beeinflussendes Polypeptid codiert, umfassend

(a) die in SEQ ID NO. 1 dargestellte Nucleotidsequenz mindestens im Bereich zwischen den Nucleotiden 58 und 88,

(b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nucleotidsequenz oder

(c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nucleotidsequenz.

2) Nucleinsäure nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine Homologie von mehr als 80% zu der in SEQ ID No. 1 dargestellten Nucleotidsequenz aufweist.

3) Modifizierte Nucleinsäure oder Nucleinsäureanalogon, die eine Nucleotidsequenz nach Anspruch 1 oder 2 oder einen mindestens 12 Basen langen Abschnitt davon aufweist.

4) Rekombinanter Vektor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er mindestens eine Kopie einer Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder einen Abschnitt davon enthält.

5) Vektor nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß er ein eukaryontischer Vektor ist.

6) Zelle,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie mit einer Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder einem Vektor nach Anspruch 4 oder 5 transformiert oder transfiziert ist.

7) Zelle,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine Säugerzelle ist.

8) Polypeptid,
dadurch gekennzeichnet,
daß es von einer Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 codiert ist.

9) Polypeptid nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß es
(a) eine in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz mindestens im Bereich zwischen den Aminosäuren 20 und 29,
(b) eine mehr als 70% zur Sequenz aus (a) homologe Aminosäuresequenz oder/und
(c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) immunologisch kreuzreaktive Aminosäuresequenz aufweist.

10) Verwendung des Polypeptids nach Anspruch 8 oder 9 oder von Fragmenten dieses Polypeptids als Immunogen zur Herstellung von Antikörpern.

11) Antikörper gegen ein Polypeptid, nach Anspruch 8 oder 9.

12) Antikörper nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß er gegen das gesamte Polypeptid oder eine Peptidsequenz entsprechend den Aminosäuren 20 bis 29 aus SEQ ID No. 2 gerichtet ist.

13) Pharmazeutische Zusammensetzung
dadurch gekennzeichnet,
daß sie als aktive Komponente umfasst:
(a) eine Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2,
(b) eine modifizierte Nucleinsäure nach Anspruch 3,
(c) einen rekombinanten Vektor nach Anspruch 4 oder 5,
(d) eine Zelle nach Anspruch 6 oder 7,
(e) ein Polypeptid nach Anspruch 8 oder 9 oder/und
(f) einen Antikörper nach Anspruch 11 oder 12.

14) Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 13 als diagnostisches Mittel.

15) Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 13 zur Herstellung eines therapeutischen Mittels.

16) Verwendung nach Anspruch 15 zur Modulation des Immunsystems.

17) Verwendung nach Anspruch 15 oder 16 zur Inhibierung der Antigenpräsentation durch MHC Klasse I Moleküle an der Oberfläche von Zellen.

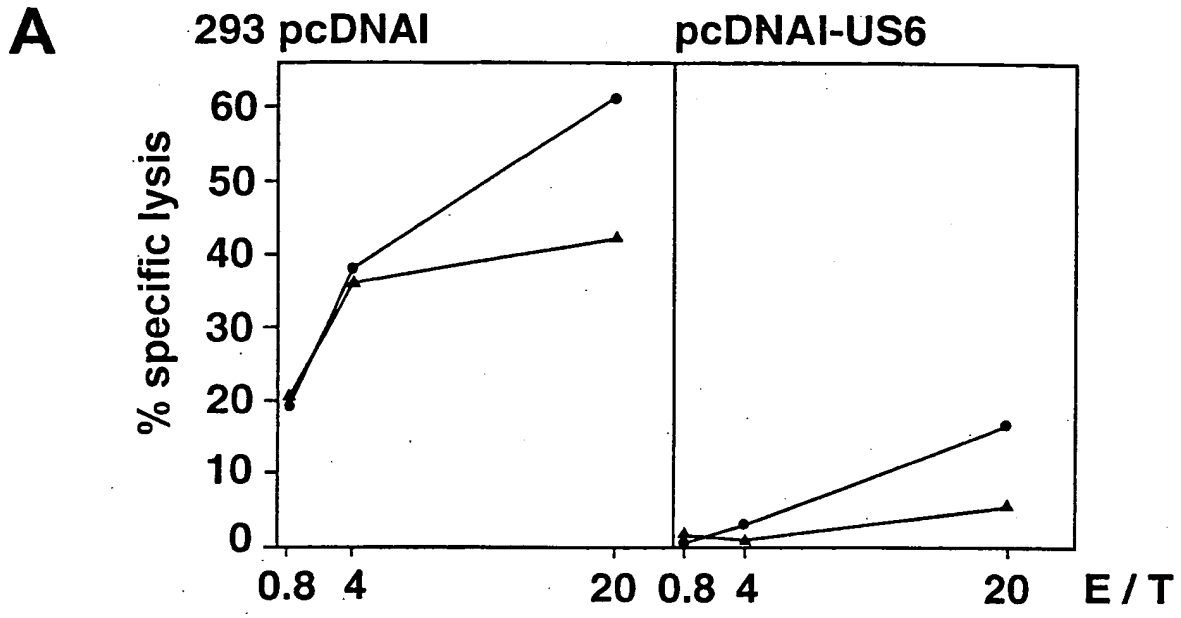
18) Verwendung nach einem der Ansprüche 14-17 in der Gentherapie.

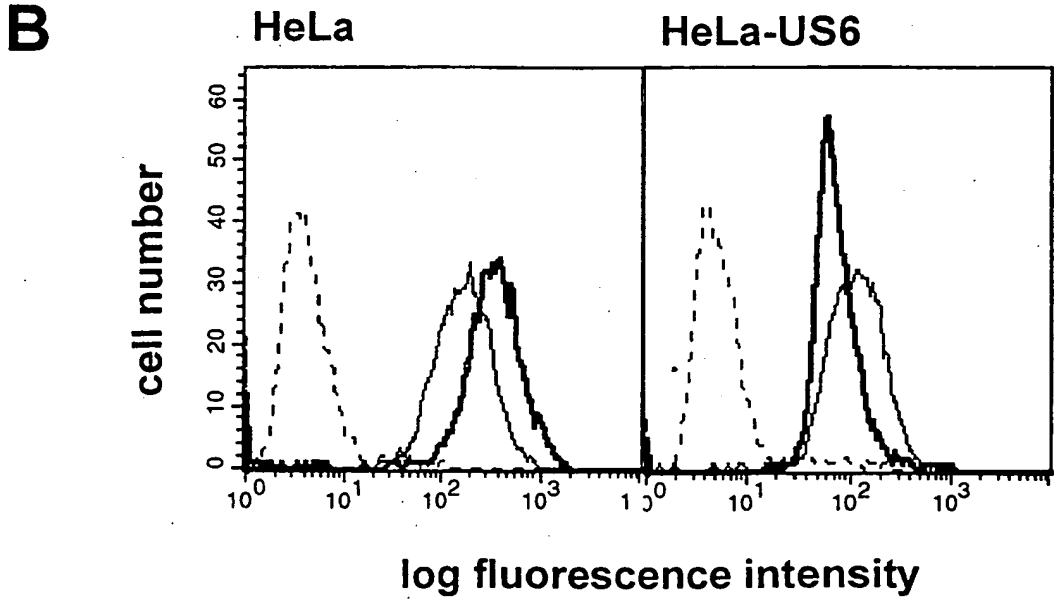
19) Verwendung nach Anspruch 18 zur Verringerung der Immunogenität von transfizierten Zellen.

20) Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 19 in Kombination mit mindestens einem weiteren immunmodulatorisch wirkenden Mittel.

21) Verwendung nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß weitere immunmodulatorisch wirkende Mittel ausgewählt ist aus viralen MHC-Klasse I Inhibitoren und dafür codierenden Nucleinsäuren.

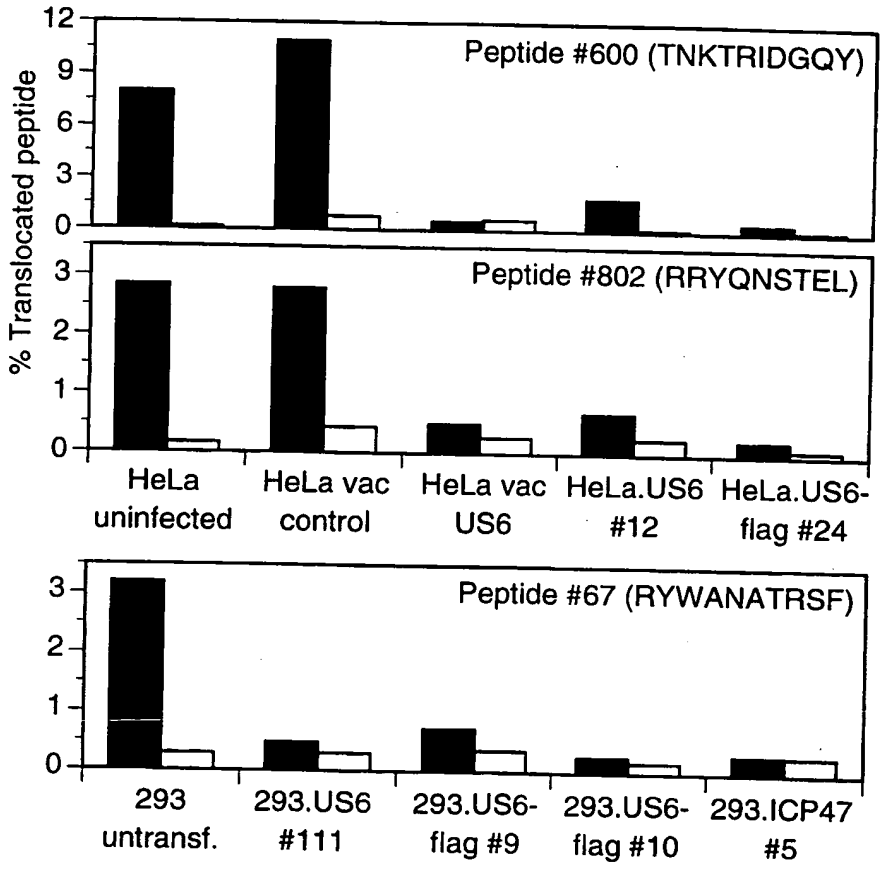
Figur 1


A
293 pcDNAI
pcDNAI-US6
% specific lysis
60
50
40
30
20
10
0
0.8 4 20 0.8 4 20
E / T


B
HeLa
HeLa-US6
cell number
0 10 20 30 40 50 60
10^0 10^1 10^2 10^3 10^0 10^1 10^2 10^3
log fluorescence intensity

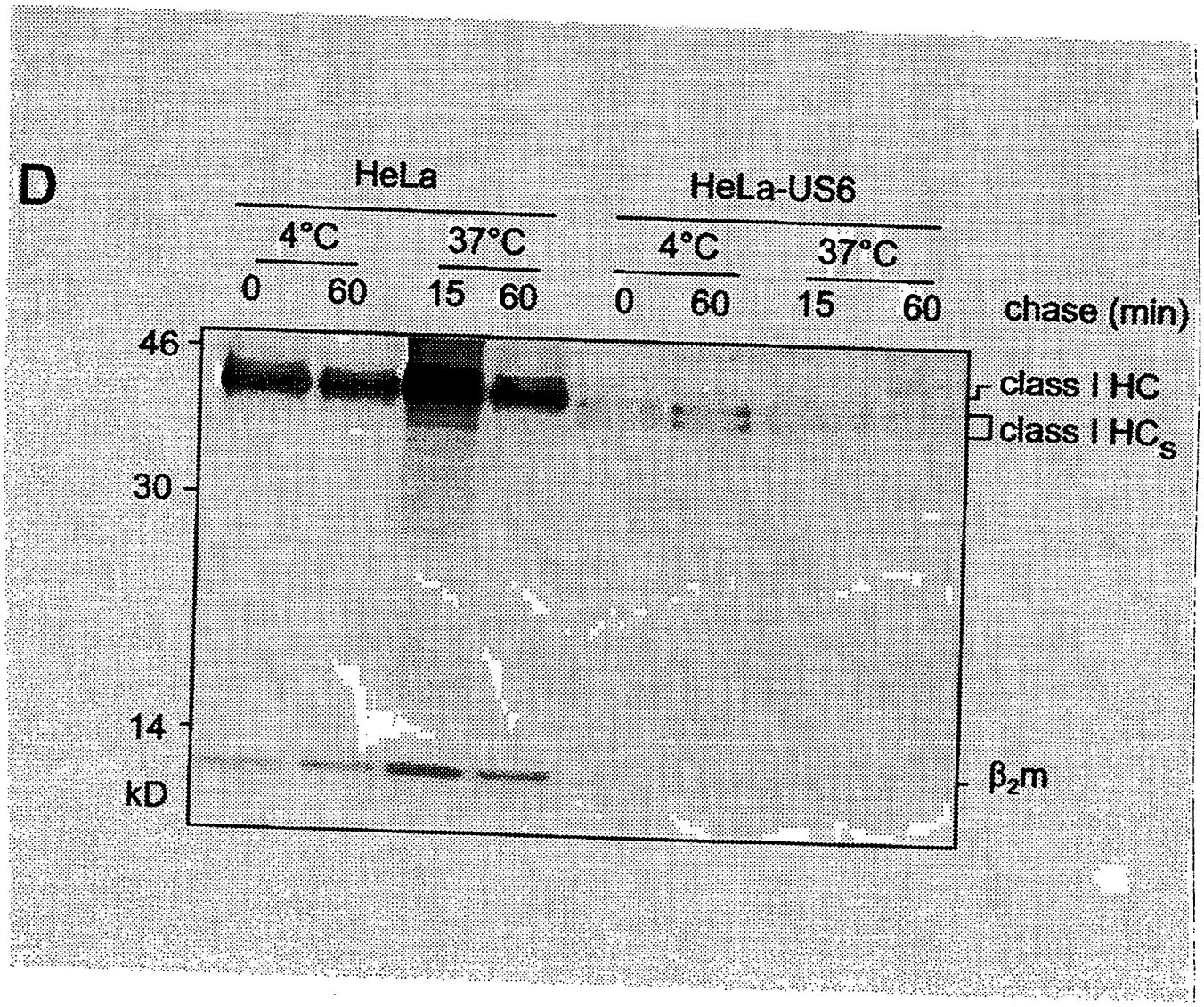
Figur 1

C



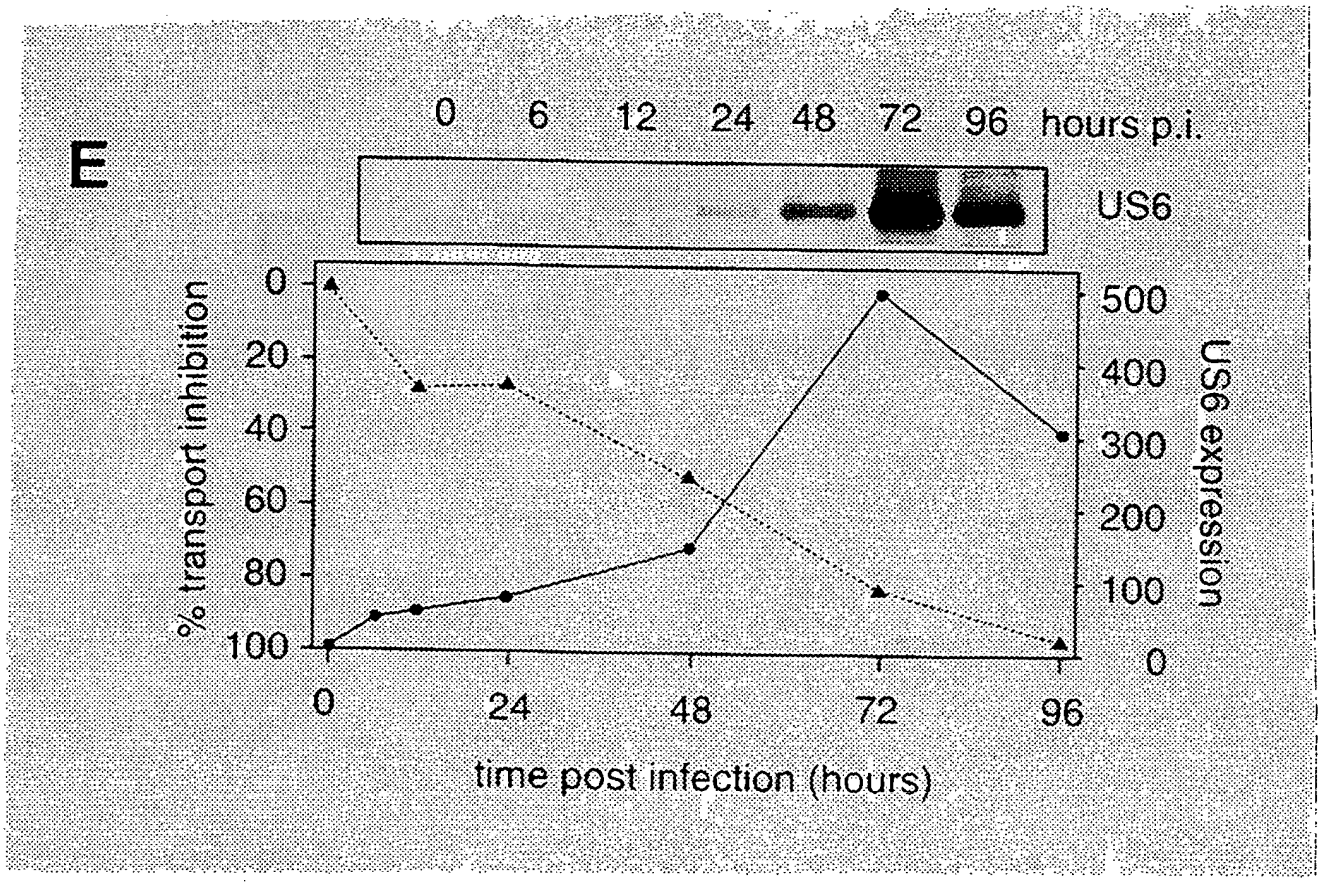
BEST AVAILABLE COPY

Figur 1



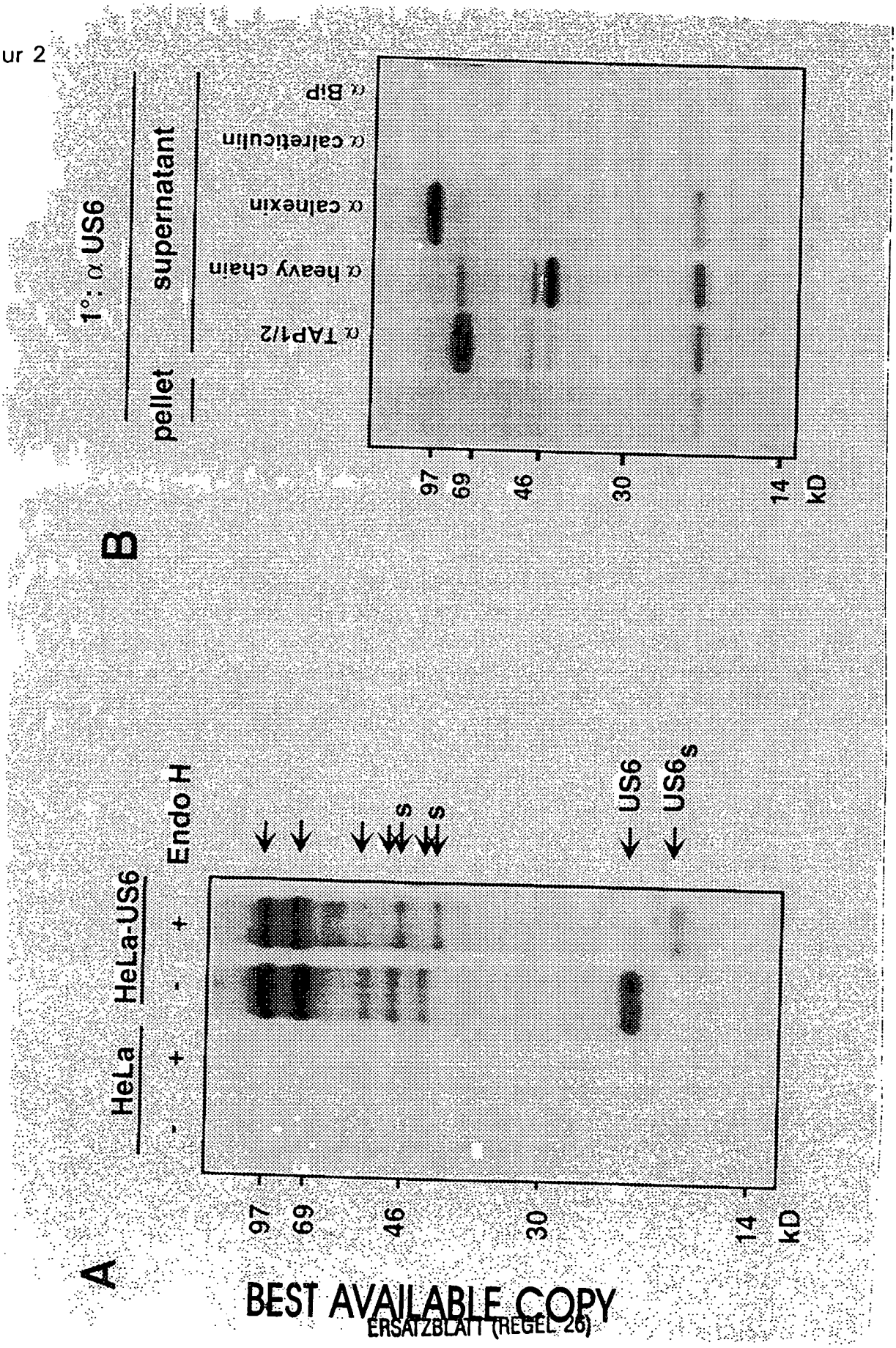
BEST AVAILABLE COPY

Figur 1



BEST AVAILABLE COPY

Figur 2



BEST AVAILABLE COPY
ERSATZBLATT (REGEL 26)